

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/01978 A1

(51)国際特許分類:
31/12, 31/16, 31/22, 31/14

A61K 31/135, A61P

(74)代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0046
大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル
Osaka (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP00/04286

(22)国際出願日: 2000年6月28日 (28.06.2000)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:
特願平11/185297 1999年6月30日 (30.06.1999) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): ウエルファイド株式会社 (WELFIDE CORPORATION)
[JP/JP]; 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号 Osaka (JP).

(71)出願人および

(72)発明者: 松森 昭 (MATSUMORI, Akira) [JP/JP]; 〒562-0045 大阪府箕面市瀬川5丁目16-22 Osaka (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。



WO 01/01978 A1

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS FOR PREVENTING OR TREATING VIRAL MYOCARDITIS

(54)発明の名称: ウイルス性心筋炎の予防または治療用医薬組成物

(57) Abstract: Medicinal compositions for preventing or treating viral myocarditis and viral diseases induced by viral myocarditis with which cell injuries in various organs are prevented and treated regardless of virus type; and a method for preventing or treating. These compositions contain, as the active ingredient, 2-amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propane-1,3-diol or pharmacologically acceptable salts thereof. The above method for preventing and treating myocarditis and viral diseases induced by viral myocarditis comprises administering an effective dose of the above compound or pharmacologically acceptable salts thereof.

/統葉有/



(57) 要約:

本発明の目的は、ウイルスの種類にかかわらず種々の臓器における細胞傷害の発症予防および治療を行うことによりウイルス性心筋炎およびウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬組成物、ならびにその予防または治療方法を提供することである。本発明は、2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するウイルス性心筋炎およびウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬組成物に関する。本発明はまた、有効量の前記化合物またはその薬理学的に許容される塩を投与することを含む、ウイルス性心筋炎およびウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療方法に関する。

明細書

ウイルス性心筋炎の予防または治療用医薬組成物

技術分野

本発明は、2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するウイルス性心筋炎またはウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬組成物、更にはウイルス性の細胞傷害の改善または予防用医薬組成物に関する。本発明はまた、2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性心筋炎またはウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療方法に関する。本発明はさらに、ウイルス性心筋炎またはウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬を製造するための2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用に関する。

背景技術

従来、ウイルス性疾患の予防にはウイルスワクチンが主として用いられているが、ワクチンは各々のウイルスに特異的なもので個々のウイルスに対してのみ有効である。しかし、ウイルスの種類は多く、現在、極めて限られたウイルスに対してのみ実用化されている。また、ウイルスは変異株が多く、同一のウイルスに対してもワクチンが有効でないことも多い。さらに副作用の少ないワクチンを数多く開発することは極めて困難である。

一方、種々の抗ウイルス剤（アシクロビル、ガンシクロビル、アラAなど）も開発され、実用化されているが、極めて限られたウイルス感染症にのみ有効で、広範なウイルス性疾患に有効な薬剤は見当たっていない。また、これらの抗ウイルス剤は副作用が強く、広く臨床に用いることは困難である。近年、インターフェロンがウイルス性肝炎等の治療に応用されているが、発熱などの副作用が高頻

度に出現している。また、インターフェロンはウイルスの増殖を抑制するが、細胞傷害を直接防御するとの報告はみられない。ガンマグロブリンは、広くウイルス性疾患の治療に用いられているが、その成績は必ずしも一定ではない。

2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール・塩酸塩を含む2-アミノプロパン-1, 3-ジオール化合物は、臓器または骨髄移植における拒絶反応の抑制剤として、また乾癬、ベーチェット病などの様々な自己免疫疾患およびリウマチ疾患の治療薬であることが知られている（国際公開WO 94/08943号）。

しかし、先行技術には、2-アミノプロパン-1, 3-ジオール化合物が、ウイルス性疾患の治療に有効であるとの記載はされていない。

発明の開示

前述のように、ウイルスには数多くの種類があり、各ウイルスに対する特異的な治療を行うのは困難である。従って、多くのウイルス性疾患において発生する種々の臓器における細胞傷害を予防または治療することが極めて重要である。ウイルス性疾患における細胞傷害はウイルスの増殖による直接的な傷害のほか、ウイルス感染によって引き起こされる種々の免疫反応が関与すると考えられている。本発明は、ウイルスの種類にかかわらず種々の臓器における細胞傷害の発症予防および治療を行うことによりウイルス性心筋炎およびウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療を行おうとするものである。

本発明者は、上記課題を解決するために、ウイルス性心筋炎またはウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療薬剤について鋭意研究を重ねてきたところ、意外にも2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩が有効であることを見だし、本発明を完成した。

即ち、本発明は以下のとおりである。

- ① 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担

体を含有するウイルス性心筋炎の予防または治療用医薬組成物。

② 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担体を含有するウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬組成物。

③ 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担体を含有するウイルス性の細胞傷害の改善または予防用医薬組成物。

④ 有効量の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性心筋炎の予防または治疗方法。

⑤ 有効量の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治疗方法。

⑥ 有効量の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性の細胞傷害の改善または予防方法。

⑦ ウィルス性心筋炎の予防または治療用医薬を製造するための2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

⑧ ウィルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬を製造するための2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

⑨ ウィルス性の細胞傷害の改善または予防用医薬を製造するための2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

⑩ ①記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性心筋炎の予防また

は治療用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

⑪ ②記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

⑫ ③記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性の細胞傷害の改善または予防用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

本発明において、ウイルス性心筋炎またはそれに惹起されるウイルス性疾患は、好適にはR N Aウイルスまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるものである。本発明において、前記R N Aウイルスは、好適にはオルトミクソウイルスまたはピコルナウイルスである。さらに本発明において、前記ウイルス性疾患は、好適にはウイルス性肝炎（A型、B型、C型、E型、G型、T T V型）、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウイルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性腸炎またはウイルス性心膜炎である。

図面の簡単な説明

図1は、試験例2における生存率の結果を示すグラフである。—■—は対照群、—●—はC s A群、—○—は化合物1群を示す。

図2は、試験例2における細胞浸潤のスコアを示すグラフである。

図3は、試験例2における心筋細胞壊死のスコアを示すグラフである。

図4は、試験例2における心臓のウイルス力価の結果を示すグラフである。

図5は、試験例2における心臓サイトカインアッセイのIL-2の結果を示すグラフである。

図6は、試験例2における心臓サイトカインアッセイのIL-12の結果を示すグラフである。

図7は、試験例2における心臓サイトカインアッセイのIFN-γの結果を示す

すグラフである。

図8は、試験例2における心臓サイトカインアッセイのTNF- α の結果を示すグラフである。

図9は、試験例2における心臓内NOアッセイの結果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

本発明における2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールは、公知化合物であり、例えば、国際公開WO 94/08943号に開示の方法等により製造することができる。

2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールは、必要に応じて適当な溶媒(水、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサンなど)中、酸(塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、酢酸、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、クエン酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、1-O-カンファースルホン酸など)と処理することにより、上記の酸との塩などの薬理学的に許容される塩とすることができます。

本発明において、2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩は、低毒性で、動物とりわけ哺乳動物(例えば、ヒト、イヌ、ウサギ、マウス、ラットなど)に対するウイルス性心筋炎またはそれから惹起されるウイルス性疾患の予防または治療薬剤として有用である。本発明で対象とするウイルス性心筋炎、またはそれから惹起されるウイルス性疾患には、DNAウイルスあるいはRNAウイルスのいずれに属する病原ウイルスによって引き起こされる疾患も含まれる。そのような病原ウイルスを以下に例示する。

DNAウイルス： ポックスウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルスなど)、アデノウイルス、パルボウイルス

RNAウイルス： レオウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、バラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、ブンヤウイルス、アレナウイルス、レトロウイルス、ピコルナウイルス、カリシウイルス

とりわけ、本発明の薬剤は、RNAウイルスまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるウイルス性心筋炎またはそれから惹起されるウイルス性疾患に罹患した患者の治療または予防に好ましく適用し得る。ここで、特にRNAウイルスとしてオルトミクソウイルスあるいはピコルナウイルスが挙げられる。

ウイルス性心筋炎から惹起されるウイルス性疾患の疾患名としては、具体的には、ウイルス性肝炎（A型、B型、C型、E型、G型、TTV型）、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ウイルス性肺炎、ウイルス性気管支炎、ヘルペス感染症（単純ヘルペス、EBウイルス（伝染性单核症）、帯状疱疹）、ポリオ、エイズ（HIV感染症）、成人T細胞白血病（ATL）、パピローマ、麻疹、風疹、突発性癰疹、伝染性紅斑、ウイルス性脳炎、ウイルス性髄膜炎、サイトメガロウイルス感染症、流行性耳下腺炎、水痘、狂犬病、ウイルス性腸炎、ウイルス性心膜炎、コクサッキーウィルス感染症、エコーウィルス感染症、腎症候性出血熱、ラッサ熱などが挙げられる。

さらに上記に挙げたウイルス性疾患の中でも、ウイルス性肝炎（A型、B型、C型、E型、G型、TTV型）、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウイルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性腸炎、ウイルス性心膜炎に対して好ましく適用可能である。

2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩は、経口的に、非経口的に、吸入法、直腸投入、あるいは局所投与により用いることができ、医薬品組成物あるいは製剤（例えば、粉末、顆粒、錠剤、ビル剤、カプセル剤、注射剤、シロップ剤、エマルジョン剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤など）として用いることができ、それらは本発明の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を単独で、あるいは

は医薬として許容される担体（アジュバント剤、賦形剤、補形剤及び／又は希釈剤など）と混合して用いることができる。医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。

本発明明細書において、非経口とは、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射あるいは点滴法などを含むものである。注射用調剤、例えば無菌注射用水性懸濁物あるいは油性懸濁物は、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤を用いて当該分野で知られた方法で調製されうる。その無菌注射用調剤は、また、例えば水溶液などの製剤上許容される非経口投与可能な希釈剤あるいは溶剤中の無菌の注射のできる溶液または懸濁液であってもよい。使用することのできるベヒクルあるいは溶剤として許されるものとしては、水、リングル液、等張食塩液などが挙げられる。さらに、通常溶剤または懸濁化溶媒として無菌の不揮発性油も用いられうる。このためには、いかなる不揮発性油も脂肪酸も使用でき、天然あるいは合成あるいは半合成の脂肪油または脂肪酸、そして天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類も包含される。

直腸投与用の座剤は、その薬物と適当な低刺激性の補形剤、例えばココアバター、やポリエチレングリコール類といった常温では固体であるが腸管の温度では液体で、直腸内で融解し、薬物を放出するものなどと混合して製造できる。

経口投与用の固形投与剤型としては、上記した粉剤、顆粒剤、錠剤、ビル剤、カプセル剤などが挙げられる。そのような剤型において、活性成分化合物は、少なくとも一つの添加物、例えばショ糖、乳糖、セルロース糖、マンニトール、マルチトール、デキストラン、デンブン類、寒天、アルギメント類、キチン類、キトサン類、ベクチン類、トラガントガム類、アラビアゴム類、ゼラチン類、コラーゲン類、カゼイン、アルブミン、合成または半合成のポリマー類またはグリセリド類と混合することができる。そのような剤型物は、通常の剤型のようにさらに別の添加物を含んでもよい。別の添加物としては、例えば不活性希釈剤、マグネシウムステアレートなどの滑沢剤、パラベン類、ソルビン酸などの保存剤、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、システインなどの抗酸化剤、崩壊剤、結合

化剤、増粘剤、緩衝化剤、甘味付与剤、フレーバー付与剤、パフューム剤などが挙げられる。錠剤およびビル剤は、さらにエンテリックコーティングすることもできる。

経口投与用の液剤としては、医薬として許容されるシロップ剤、エマルジョン剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤などが挙げられる。これらは、当該分野で普通用いられる不活性希釈剤、例えば水を含んでいてもよい。

ある特定の患者の投与量は、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行っている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩は、低毒性で安全に使用することができる。当該化合物の1日の投与量は、患者の状態や体重、投与経路などによって異なるが、例えば成人のウイルス性心筋炎またはそれから惹起されるウイルス性疾患の治療薬剤として投与する場合、経口投与では、一日量約0.01~150mg、好ましくは0.1~100mg、静注では、一日量約0.01~50mg、好ましくは0.01~20mgを1回または2回ないし3回に分けて投与するのが好ましい。

実施例

以下に、試験例によって本発明の効果を明らかにするが、これらは単なる例示であり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

試験例 1

ウイルス性心筋炎に対する効果

化合物1：2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩

(1) 生存率

方法

4週齢D B A／2マウスを3グループに分け、E M C (Encephalomyocarditis)

ウイルス 10 p.f.u を腹腔内接種し、接種後から、対照として蒸留水（溶媒）（グループA、n=11）、化合物1を1mg/kg/日（グループB、n=10）、3mg/kg/日（グループC、n=10）を、連日14日後までゾンデを用いて強制経口投与した。14日後の各グループの生存率は、Kaplan-Meier法によって比較した。

結果

対照群（グループA、n=11）は、8日後までに全て死亡した（生存率0%）が、化合物1投与群の14日後の生存率は、グループB（n=10）で1匹（生存率10%）、グループC（n=10）で3匹（生存率30%）であり、3mg/kg/日群で統計的に有意な生存率の改善がみられた（p<0.05）。

（2）心臓の病理組織学的所見

方法

4週齢DBA/2マウスを3グループに分け、EMC(Encephalomyocarditis)ウイルス10 p.f.uを腹腔内接種し、接種後から、対照として蒸留水（溶媒）（n=9）、化合物1を3mg/kg/日（n=8）、10mg/kg/日（n=8）を、連日5日後までゾンデを用いて強制経口投与した。5日後に心臓を採取し、ホルマリン固定後ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、心臓壊死、細胞浸潤の2項目につき、以下のようにスコア化した。

0；病変なし、1+；心臓の25%以下の病変、2+；25%より多く、50%以下の心臓の病変、3+；50%より多く、75%以下の心臓の病変、4+；75%より多く、100%以下の心臓の病変

結果

心臓の病理組織学的所見の結果を表1に示す。

表 1

	心筋細胞壞死	細胞浸潤
対照群	1.9±0.2	2.0±0.2
3mg/kg/日投与群	1.7±0.4	1.6±0.2
10mg/kg/日投与群	1.0±0.2*	1.1±0.2*

平均±SEM, *p<0.05 (vs. 対照群)

表 1 より、EMC ウィルス接種 5 日後的心臓の心筋細胞壞死、細胞浸潤は 10 mg/kg/日投与群で用量依存的に改善がみられた。

以上の結果から、2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩は、EMC ウィルス感染によるマウスの死亡率を改善し、ウィルス性心筋炎を改善し、ウィルス感染に有効であることが明らかになった。

上記拡張型心筋症の動物モデルについては、Circulation. 65:1230-1235, 1982 または Circulation. 66:355-360, 1982 に記載されている。

試験例 2

化合物 1 と免疫抑制剤であるシクロスボリン A (以下、CsA という)とのウィルス性心筋炎に対する効果を比較した。化合物 1 は滅菌蒸留水に溶解して投与し、CsA はオリーブ油に溶解したもの投与した。

(1) 生存率

方法

4 週齢雄性 DBA/2 マウスを 3 グループに分け、EMC ウィルス 10 p.f.u を腹腔内接種し、接種後から、対照として蒸留水 (溶媒) (対照群、n=21)、CsA を 40 mg/kg/日 (CsA 群、n=9)、化合物 1 を 10 mg/kg/日 (化合物 1 群、n=22) の投与量で、連日 14 日後までゾンデを用いて強制経口投与した。14 日後の各グループの生存率は、Kaplan-Meier 法によって比較した。

結果

結果を図1に示す。対照群（-■-）は、10日目までに全て死亡した（生存率0%）。CsA群（-●-）は7日目までに全て死亡し、対照群と比べて生存率が有意に悪化した。これに対して、化合物1群（-○-）の14日後の生存率は27%（22匹中6匹生存）であった。CsA群と対照群との生存率には有意差があった（*p<0.05）。

（2）心臓の病理組織学的所見

方法

4週齢雄性DBA/2マウスを3グループに分け、EMCウイルス10pfuを腹腔内接種し、接種後から、対照として蒸留水（溶媒）(n=9)、CsAを40mg/kg/日(n=6)、化合物1を10mg/kg/日(n=8)の投与量で、連日5日後までゾンデを用いて強制経口投与した。5日後に心臓を採取し、ホルマリン固定後ヘマトキシリンーエオジン染色を行い、心筋細胞壊死、細胞浸潤の2項目につき、試験例1に記載した基準に従ってスコア化した。

心筋細胞壊死および細胞浸潤のスコアは、2人の観察者によって独立して評価し、平均した。統計学的分析は one way analysis of variance (ANOVA)、Fisher's protected least significant difference testにより行った。

結果

結果を図2（細胞浸潤）、図3（心筋細胞壊死）および表2に示す。

表2

	細胞浸潤	心筋細胞壊死
対照群	2.00±0.19	1.89±0.23
CsA群	1.50±0.26(NS)	2.00±0.32(NS)
化合物1群	1.06±0.19**	1.00±0.19*

平均±SEM, NS:有意差なし, **p<0.01, *p<0.05 (vs.対照群)

CsA群における細胞浸潤のスコアは対照群のスコアと比べて低かったが、有

意差はなかった。CsA群における心筋細胞壞死のスコアは対照群のスコアよりもわずかに高かったが、有意差はなかった。これに対して、化合物1群においては、細胞浸潤、心筋細胞壞死のスコアはともに対照群のスコアと比べて有意に低かった。従って、化合物1の投与により心筋細胞壞死、細胞浸潤について有意な改善効果が認められた。

(3) 心臓のウイルス力価

方法

4週齢雄性D B A / 2マウスを3グループに分け、EMCウイルス10 p f uを腹腔内接種し、接種後から、対照として蒸留水（溶媒）(n=8)、CsAを40 mg/kg/日(n=5)、化合物1を10 mg/kg/日(n=7)の投与量で、連日5日後までゾンデを用いて強制経口投与した。5日後にマウスから無菌的に採取した心室の重量を測定し、リン酸緩衝食塩水(PBS, 1 ml)中でホモジナイズした。4°C、1,500 gにて15分間遠心分離した後、上清から0.1 mlをとり、ヒト羊膜FL細胞単層に接種し、5% CO₂中、37°Cで60分間培養した。この細胞を、4%ウシ胎児血清および1%メチルセルロースを含有する培地(3 ml)でおおった。5% CO₂含有温潤雰囲気下、37°Cにて20時間培養後、細胞を酢酸-メタノール(1:2)で固定し、1%クリスタルバイオレットで染色し、倒立顕微鏡下でブラーク数をカウントした(Circulation. 89:846-851, 1994)。ブラーク数が多すぎてカウントできない場合は、上清をダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)により適当に希釀した後、同様のアッセイを繰り返した。試験を2回行い、その平均を算出した。ウイルス力価はp f u/g心臓として表した。統計学的分析はone way ANOVA、Fisher's protected least significant difference testにより行った。

結果

結果を図4および表3に示す。

表3

	ウイルス力価(pfu/g 心臓)
対照群	5.18±2.73 × 10 ⁶
CsA群	9.94±6.30 × 10 ⁷ *
化合物1群	1.23±0.53 × 10 ⁷ (NS)

平均±SEM, NS:有意差なし, *p<0.05 (vs. 対照群)

CsAは心臓におけるウイルス複製を対照群と比べて約20倍増加させた。これに対して、化合物1はCsAのようなウイルス複製を増加させる効果を示さなかった。

(4) 心臓サイトカインアッセイ

方法

上記(3)で5日目に採取したマウス心室を、超音波ホモジナイザーを用いてPBS(1ml)中でホモジナイズし、4°C、14,000 rpmにて20分間遠心分離し、上清をIL-2、IL-12、IFN-γおよびTNF-αのアッセイの試料として使用した。各サイトカインの蛋白濃度は、市販のキットを使用してELISAにより測定した(Circulation. 100:1102-1108, 1999)。マウスIL-2およびIFN-γのELISAキットはGENZYME Corporation, Cambridge, U.S.A.から、マウスIL-12およびTNF-αのELISAキットはENDOGEN Inc., Cambridge, U.S.A.から購入した。

各上清中の総蛋白濃度は、ビシンコニン酸(BCA)法により測定し、総蛋白濃度に対するサイトカイン濃度の割合を算出した(J. Am. Coll. Cardiol. 33:1400-1407, 1999)。各サイトカイン蛋白濃度はpg/mg総蛋白またはng/mg総蛋白として表した。統計学的分析はone way ANOVA、Fisher's protected least significant difference testにより行った。

結果

結果を図5～8および表4に示す。

表 4

	I L - 2 (ng/mg 総蛋白)	I L - 1 2 (pg/mg 総蛋白)	I FN - γ (pg/mg 総蛋白)	T NF - α (ng/mg 総蛋白)
対照群	12.79±1.24	71.76± 7.37	151.20±15.66	4.11±0.11
C s A群	3.91±0.31#	15.75± 4.67#	59.15± 9.41#	4.73±0.17*
化合物 1 群	6.06±0.67#	46.00±12.82*	108.86±12.98*	3.72±0.25**

平均±SEM, #p<0.001 (vs. 対照群)

*p<0.05 (vs. 対照群)

**p<0.01 (vs. C s A群)

T細胞増殖に関連することが知られている I L - 2 濃度は、C s A群および化合物 1 群の両方において抑制された。しかし、化合物 1 群における I L - 2 抑制の程度は、C s A群と比べて弱かった。ウイルス複製を阻害する効果を有する I FN - γ の濃度(Jpn. Circ. J. 51:661-664, 1987)は、C s A群では著しく減少したが、化合物 1 群では減少の程度が少ない。同様に、T h 1 (1型ヘルパーT細胞)特異的サイトカインである I L - 1 2 の濃度は、C s A群では著しく減少しているが、化合物 1 群では減少の程度が少ない。これとは逆に、炎症性サイトカインの一つである T NF - α の濃度は、C s A群では対照群と比べて上昇しているが、化合物 1 群では影響がなかった。

(5) 心臓内一酸化窒素 (N O) アッセイ

心臓内 N O 含量を、サイトカインアッセイに使用したのと同じ上清を使用して、Griess 法の変法(J. Am. Coll. Cardiol. 33:1400-1407, 1999; Anal. Biochem. 224:502-508, 1995)により測定した。簡単に説明すると、上清または標品亜硝酸塩(50 μ l)を10 μ M β NADPH(10 μ l)と混合し、予め混合しておいたマスターミックス(500 μ M グルコース-6-ホスフェート、160 U/1 グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、80 U/1 ニトレートレダクターゼ、0.2 mM リン酸緩衝液)(40 μ l)を添加して、20°Cで45分

間インキュベートした。5% H₃PO₄中の1%スルファニルアミド(50μl)および0.1%ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩(50μl)をさらに添加し、20°Cで10分間インキュベートした。540nmにおける光学密度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。標品に基づいて各サンプルの亜硝酸塩濃度を算出した。各サンプルと標品の測定を2回ずつ行った。心臓内NO含量の値は、各亜硝酸塩濃度を各上清中の総蛋白濃度で割ることにより決定し、μM/mg総蛋白として表す。統計学的分析はone way ANOVA、Fisher's protected least significant difference testにより行った。

結果

結果を図9および表5に示す。

表5

	NO含量 (μM/mg 総蛋白)
対照群	2.07±0.20#
CsA群	4.56±0.68
化合物1群	1.91±0.34#

平均±SEM, #p<0.001 (vs. CsA群)

CsA群では対照群と比較して心臓内NO含量が有意に増加したが、化合物1群では対照群と有意な差はなかった。

上記の結果をまとめると、心臓におけるIL-2、IL-12、IFN-γの発現は化合物1群およびCsA群の両方において対照群と比べて抑制されるが、化合物1群においては抑制の程度が弱かった。TNF-αおよびNOはCsA群で有意に増加したが、化合物1群では対照群と有意差はなかった。IL-2はT細胞増殖に関連し、T細胞、NK細胞からのIFN-γの産生を誘導する作用を有する。Th1特異的サイトカインであるIL-12はT細胞、NK細胞からのIFN-γの産生を誘導する作用を有する。IFN-γはマクロファージを活性

化することによりウイルス増殖阻害作用を示す。従って、IL-2、IL-12、IFN- γ の発現抑制の程度が、化合物1群に比べて、CsA群において高いという上記の結果は、CsAはウイルス複製を増加させるが、化合物1にはそのような作用がなかったという上記(3)の結果と一致する。また炎症性サイトカインであるTNF- α は細胞傷害活性があり、NOは心筋損傷を引き起こすことが知られている。上記の結果から、CsAはTNF- α 、NOを増加させるが、化合物1はTNF- α 、NOを増加させないことが判明した。従って、化合物1はウイルス性の細胞傷害の改善に有効である。

以上の結果から、化合物1(2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオール塩酸塩)は、ウイルス複製を誘導することなく、ウイルス性心筋炎の治療に有効であることが明らかになった。

シクロスボリンなどの免疫抑制剤は、臓器移植または骨髄移植後の免疫抑制療法に使用されているが、サイトメガロウイルスなどのウイルスによる重篤な感染症を引き起こすことが問題となっている。上記の試験結果から明らかなように、本発明に係る2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオールは、従来の免疫抑制剤と異なり、ウイルス増殖を誘導する作用がないため、臓器移植または骨髄移植後の免疫抑制療法においても、サイトメガロウイルスのようなウイルスによる感染症を誘発する可能性が極めて低いと考えられる。

処方例

(1) 錠剤

下記組成物の化合物1含有錠剤を製造する。

化合物1	1 mg
乳糖	90 mg
結晶セルロース	25 mg
ステアリン酸マグネシウム	4 mg

(2) ソフトカプセル剤(1カプセル中)

化合物 1	3 0 m g
ポリエチレングリコールー 3 0 0	3 0 0 m g
ポリソルベート 8 0	2 0 m g

製造方法

化合物 1 にポリエチレングリコールー 3 0 0 およびポリソルベート 8 0 を加え、
ソフトカプセルに充填して製造する。

(3) 注射剤 (1 アンブル 1 0 m l 中)

化合物 1	0. 3 % (3 0 m g)
ポリエチレングリコールー 3 0 0	2 0 % (2 g)
エタノール	6 0 % (6 g)

注射用蒸留水で全量 1 0 m l とする。

製造方法

化合物 1 にエタノールおよびポリエチレングリコールー 3 0 0 を加えて溶解し、
注射用蒸留水を加えて全量 1 0 m l とする。

1 アンブル中化合物 1 を 3 0 m g 含有した注射剤を得る。

産業上の利用可能性

本発明によると、ウイルスに起因する細胞傷害に対して 2-アミノ-2-(2-
(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬
理学的に許容される塩の投与によって改善効果が認められ、ウイルス性心筋炎ま
たはウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の治療効果があり、また
該疾患の予防にも有効である。

本出願は、日本で出願された平成 11 年特許第 185297 号を基礎として
おり、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担体を含有するウイルス性心筋炎の予防または治療用医薬組成物。
2. 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担体を含有するウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用医薬組成物。
3. ウィルス性心筋炎またはそれに惹起されるウイルス性疾患がRNAウイルスまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるものである請求項1または2記載の予防または治療用医薬組成物。
4. RNAウイルスがオルトミクソウイルスまたはピコルナウイルスである請求項3記載の予防または治療用医薬組成物。
5. ウィルス性疾患がウィルス性肝炎(A型、B型、C型、E型、G型、TTV型)、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウィルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウィルス性腸炎またはウィルス性心膜炎である請求項2記載の予防または治療用医薬組成物。
6. 2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩、および医薬的に許容される担体を含有するウイルス性の細胞傷害の改善または予防用医薬組成物。
7. 有効量の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性心筋炎の予防または治疗方法。
8. 有効量の2-アミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治疗方法。
9. ウィルス性心筋炎またはそれに惹起されるウイルス性疾患がRNAウイル

スまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるものである請求項 7 または 8 記載の方法。

10. RNAウイルスがオルトミクソウイルスまたはピコルナウイルスである請求項 9 記載の方法。

11. ウィルス性疾患がウィルス性肝炎（A型、B型、C型、E型、G型、T T V型）、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウィルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウィルス性腸炎またはウィルス性心膜炎である請求項 8 記載の方法。

12. 有効量の 2-アミノ-2-（2-（4-オクチルフェニル）エチル）プロパン-1，3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩を投与することを含むウィルス性の細胞傷害の改善または予防方法。

13. ウィルス性心筋炎の予防または治療用医薬を製造するための 2-アミノ-2-（2-（4-オクチルフェニル）エチル）プロパン-1，3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

14. ウィルス性心筋炎により惹起されるウィルス性疾患の予防または治療用医薬を製造するための 2-アミノ-2-（2-（4-オクチルフェニル）エチル）プロパン-1，3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

15. ウィルス性心筋炎またはそれに惹起されるウィルス性疾患がRNAウイルスまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるものである請求項 13 または 14 記載の使用。

16. RNAウイルスがオルトミクソウイルスまたはピコルナウイルスである請求項 15 記載の使用。

17. ウィルス性疾患がウィルス性肝炎（A型、B型、C型、E型、G型、T T V型）、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウィルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウィルス性腸炎またはウィルス性心膜炎である請求項 14 記載の使用。

18. ウィルス性の細胞傷害の改善または予防用医薬を製造するための 2-ア

ミノ-2-(2-(4-オクチルフェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオールまたはその薬理学的に許容される塩の使用。

19. 請求項1記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性心筋炎の予防または治療用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

20. 請求項2記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性心筋炎により惹起されるウイルス性疾患の予防または治療用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

21. ウィルス性心筋炎またはそれに惹起されるウイルス性疾患がRNAウイルスまたは肝炎ウイルスによって引き起こされるものである請求項19または20記載の商業パッケージ。

22. RNAウイルスがオルトミクソウイルスまたはビコルナウイルスである請求項21記載の商業パッケージ。

23. ウィルス性疾患がウィルス性肝炎(A型、B型、C型、E型、G型、T型V)、アデノウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルペス感染症、ウィルス性脳炎、サイトメガロウイルス感染症、ウィルス性腸炎またはウィルス性心膜炎である請求項20記載の商業パッケージ。

24. 請求項6記載の医薬組成物、および該医薬組成物をウイルス性の細胞傷害の改善または予防用途に使用することができる、または使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む商業パッケージ。

図 1

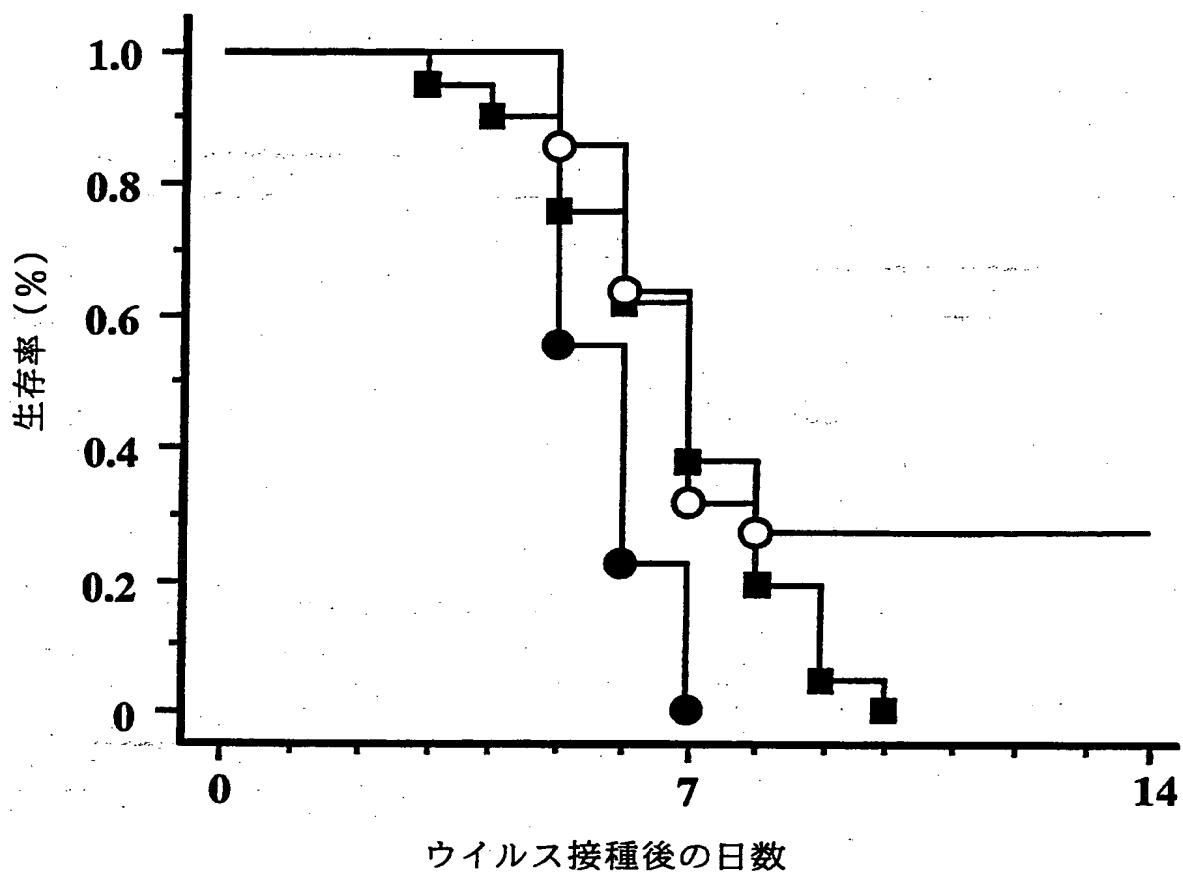


図 2

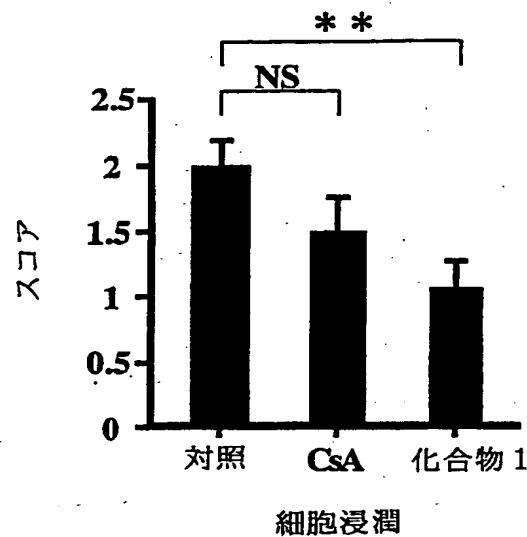


図 3

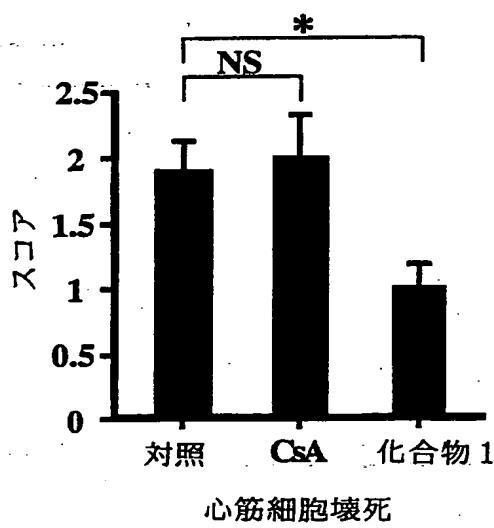


図 4

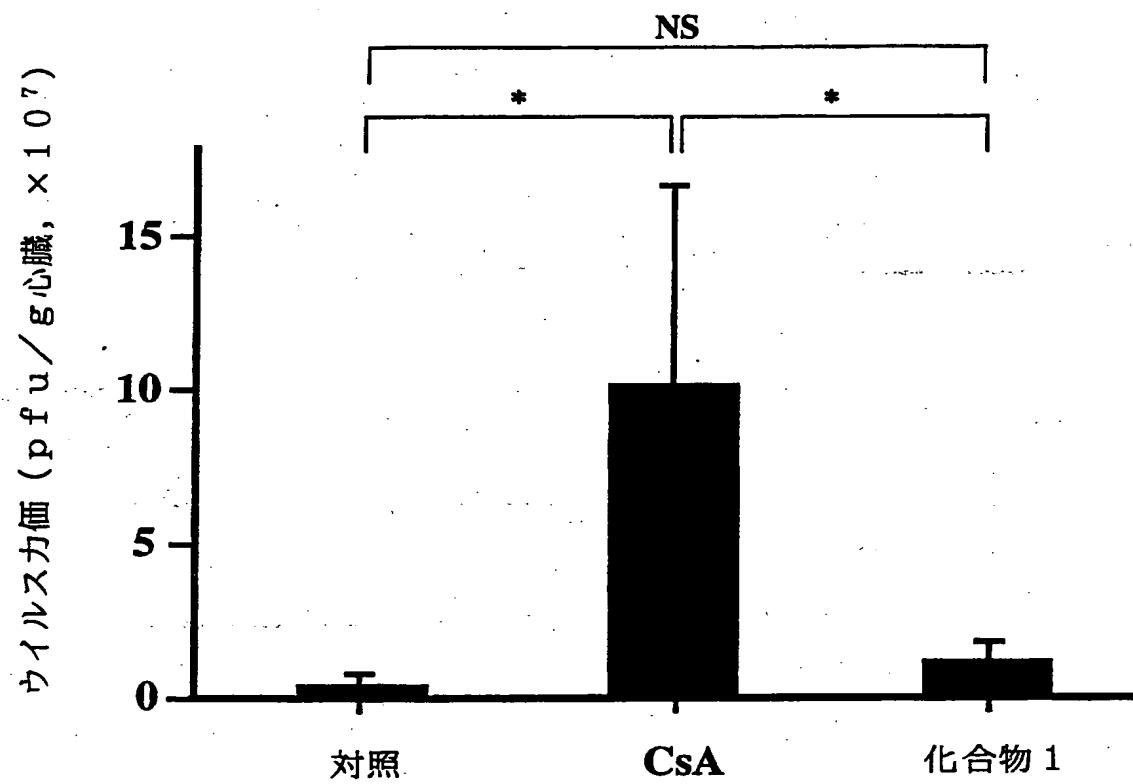


図 5

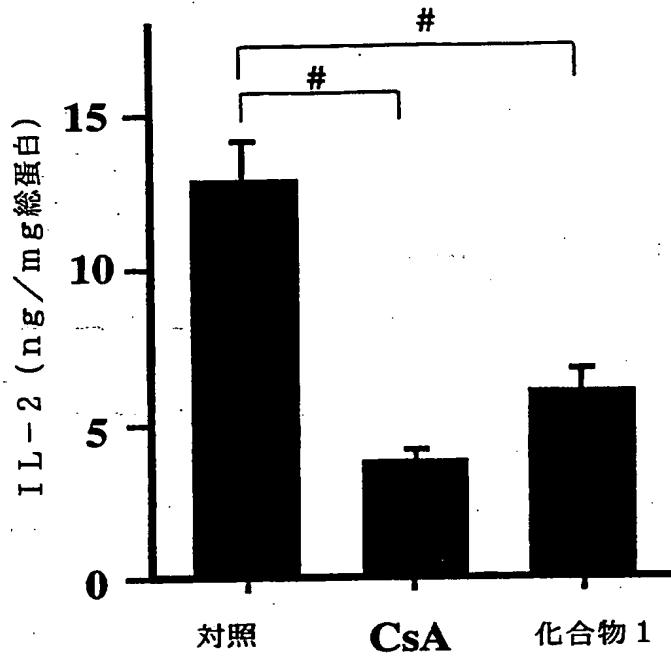


図 6

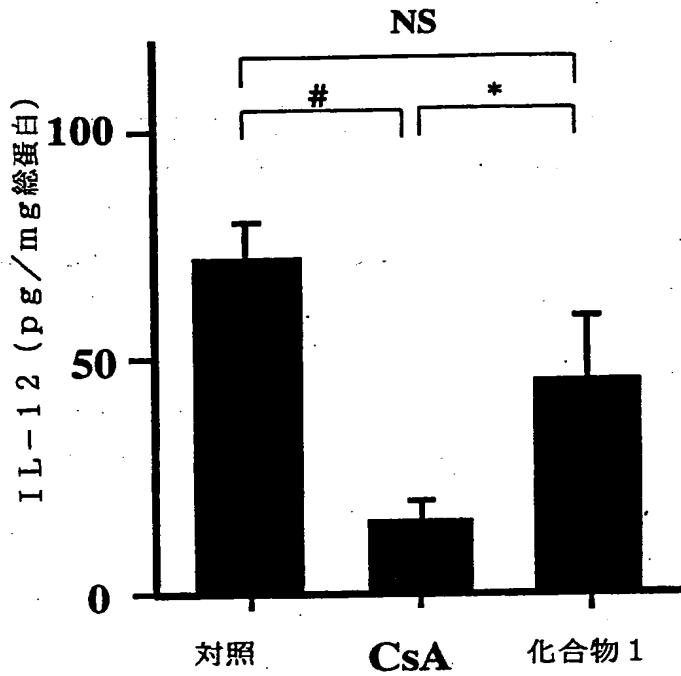


図 7

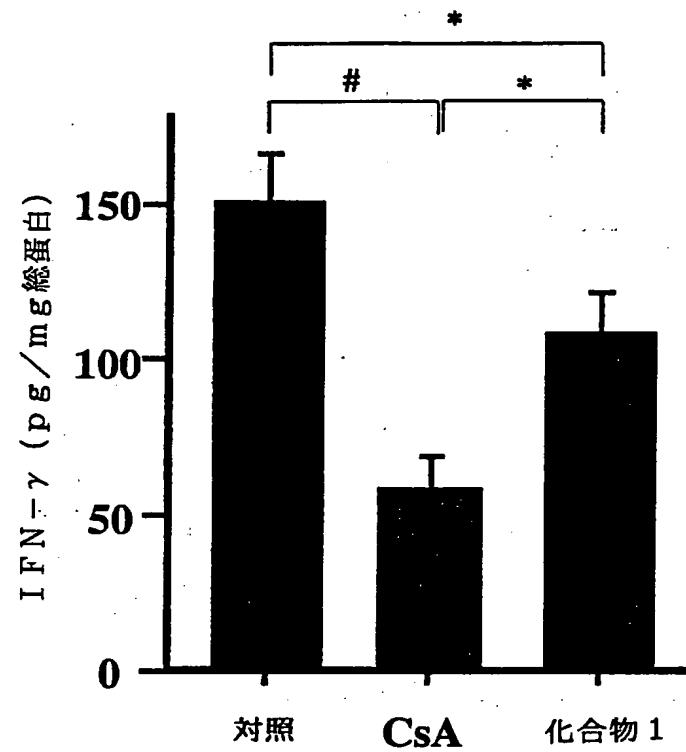


図 8

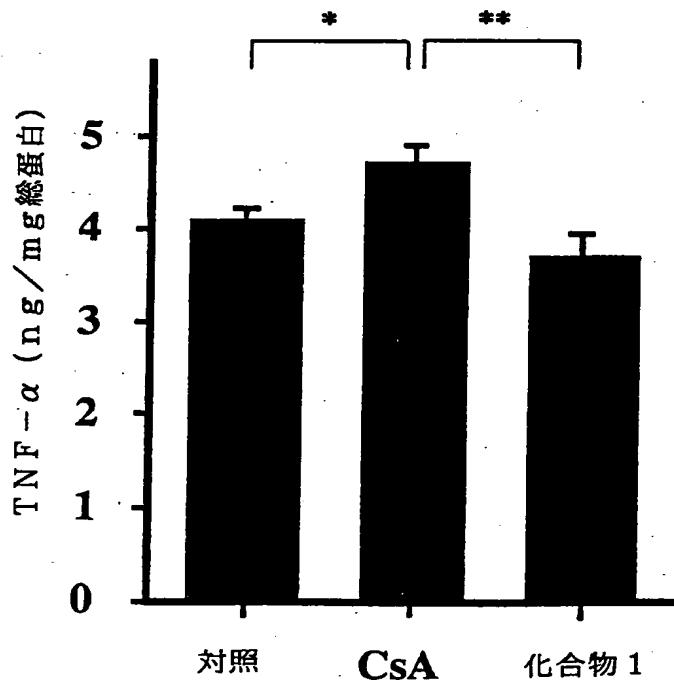
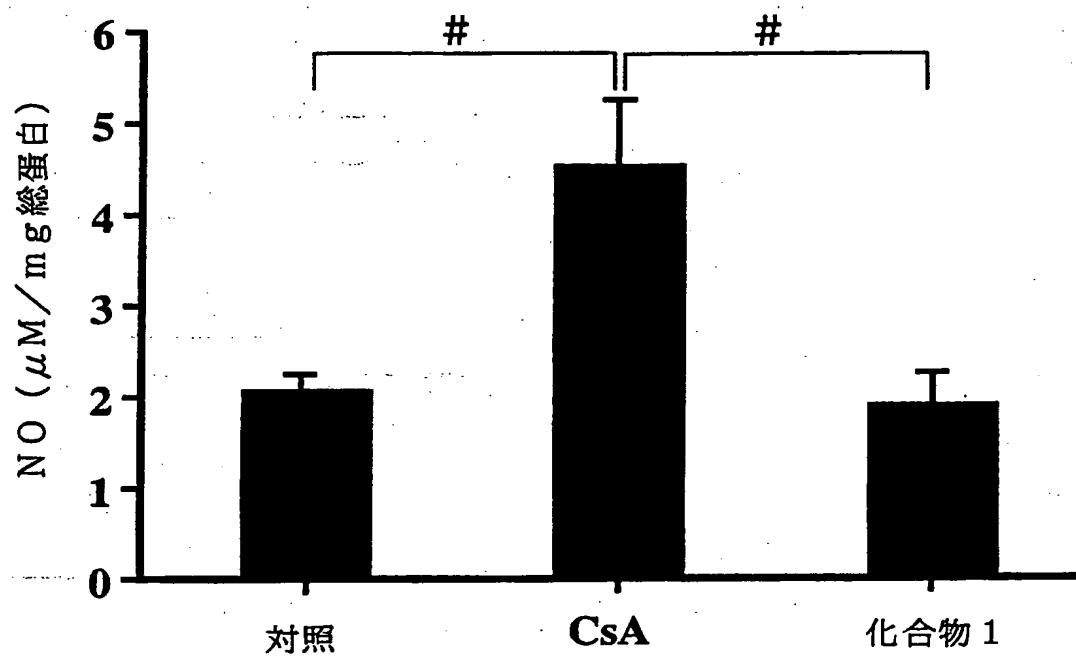


図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' A61K31/135, A61P31/12, 31/16, 31/22, 31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' A61K31/135, A61P31/12, 31/16, 31/22, 31/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/37875, A1 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.), 03 September, 1998 (03.09.98), Claims, page 6, line 16 to page 9, line 10 & AU, 9861155, A1 & EP, 990440, A1	2,3,5,14,15, 17,20,21,23, 1,4,6,13,16,18 19,22,24
A	WO, 98/03162, A1 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.), 29 January, 1998 (29.01.98), Claims, page 5, line 25 to page 8, line 20 & AU, 9734608, A1	2,3,5,14,15, 17,20,21,23, 1,4,6,13,16, 18,19,22,24
A	WO, 94/08943, A1 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.), 28 April, 1994 (28.04.94) & CA, 2126337, A & EP, 627406, A1 & US, 5604229, A	1-6,13-24

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 06 September, 2000 (06.09.00)	Date of mailing of the international search report 19 September, 2000 (19.09.00)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04286

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 7-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
They pertain to methods for treatment of the human body by therapy (Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/04286

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int. C1' A61K31/135, A61P31/12, 31/16, 31/22, 31/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
 Int. C1' A61K31/135, A61P31/12, 31/16, 31/22, 31/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
 CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/37875, A1 (吉富製薬株式会社) 03. 9月. 1998 (03. 09. 98)	2, 3, 5, 14, 15, 17, 20, 21, 23
A	(請求の範囲、第6頁16行～第9頁10行) & AU, 9861155, A1 & EP, 990440, A1	1, 4, 6, 13, 16, 18, 19, 22, 24
X	WO, 98/03162, A1 (吉富製薬株式会社) 29. 1月. 1998 (29. 01. 98)	2, 3, 5, 14, 15, 17, 20, 21, 23
A	(請求の範囲、第5頁25行～第8頁20行) & AU, 9734608, A1	1, 4, 6, 13, 16, 18, 19, 22, 24

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06. 09. 00	国際調査報告の発送日 19.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 今村玲英子 印 4C 8517 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 94/08943, A1 (吉富製薬株式会社) 28. 4月. 1994 (28. 04. 94) & CA, 2126337, A & EP, 627406, A1 & US, 5604229, A	1-6, 13-24

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO/04286

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 7-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
治療による人体の処置方法に関するものである。（PCT第17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv))
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。